УДК 619:636.09:633.88

Сазыкина К.И., Енгашев С.В. , Волков А. А., Староверов С. А., Козлов С.В.

КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ДОКСИЦИКЛИНА, ЛАКТУЛОЗЫ И БРОМГЕКСИНА

Резюме: В работе представлены данные о конструировании антибактериального препарата, обладающего комплексным действием, на основе доксициклина, лактулозы и бромгексина. Обосновано сочетание компонентов в препарате. Получены данные об острой токсичности разработанного антибактериального комплекса. Изучение острой токсичности препарата при введении в желудок проводили на белых мышах и цыплятах бройлерах. Определен класс токсичности - разработанный препарат относится к 3-ому классу слаботоксичных соединений. Изучены фармакокинетические свойства представленного антибактериального препарата: при однократном введении разработанный препарат интенсивно всасывается в кровь и через 1 час достигает максимальной концентрации (Cmax = 0,00419мг/мл). Доказано, что антибиотик доксициклин длительное время находится в крови: T1/2 = 5 ч. Изучено максимальное время нахождения в крови: при дозе 20 мг/кг доксициклин обнаруживается в течение 120 часов. Полученные данные свидетельствуют о пролонгированном действии разработанного антибактериального комплекса. На основании полученных экспериментальных данных установлено, что для терапевтических целей препарат может вводиться птице в дозе 10 мг/кг, один раз в день.

Ключевые слова: антибиотические средства, доксициклин, бромгексин, лактулоза, острая токсичность, фармакокинетика, токсикология.

Как известно, в настоящее время, приоритетными направлениями в биофармацевтической отрасли, а так же в гуманной и ветеринарной медицине остаются: конструирование наноразмерных структур для адресной доставки лекарственных веществ [1,2,3], разработка современных экспресс методов диагностики заболеваний различной этиологии [4, 5], а так же поиск эффективных противомикробных средств или их комбинаций, обладающих комплексным профилактическим и терапевтическим потенциалом.

Поскольку большинство антибактериальных препаратов обладает выраженным токсическим действием, в частности негативно воздействуя на печень - центральный орган метаболизма, который активно участвует в дезинтоксикации токсических веществ [6], то особое внимание при разработке противомикробных средств должно уделяться снижению токсичности предлагаемых препаратов и повышению их биодоступности.

Наиболее приемлемый и целесообразный метод, повышающий эффективность химиотерапии бактериальных инфекций и замедляющий развитие резистентности у микроорганизмов - рациональное применение в составе препаратов различных вспомогательных терапевтических средств, повышающих резистентность животного организма к патогенам [7, 8].

Цель данного исследования: конструирование эффективного антибактериального препарата на основе доксициклина, лактулозы и бромгексина, обладающего комплексным действием, и определение его основных токсикологических и фармакокинетических свойств.

Материалы и методы исследований.

Предмет исследования - комбинированный антибактериальный препарат, представляющий собой сочетание следующих компонентов: доксициклина гиклат - 100 мг/мл, бромгексина гидрохлорид - 5 мг/мл, а в качестве вспомогательных веществ - лактулоза – 100 мг/мл и солюфор (поливинилпирролидон).

Изучение острой токсичности препарата при введении в желудок проводили на 36 белых мышах-самцах и 36 цыплятах бройлерах РОСС 308 возрастом 5 суток. Исходный вес мышей колебался в пределах 21-22 г., вес цыплят бройлеров 65-72г. Разработанный препарат предварительно разводили водой в соотношении 1:5, с целью получения адекватных объемов для орального введения.

При изучении острой токсичности на белых мышах-самцах было сформировано 6 групп по 6 животных в каждой, и испытано 6 доз: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 0,7 г/кг массы тела (по действующему веществу – док-

сициклина гиклат). Каждая доза вводилась 6 животным в желудок при помощи зонда. Контрольным животным вводили воду в тех же объемах.

При изучении острой токсичности на цыплятах бройлерах было сформировано 6 групп по 6 цыплят и испытано 6 доз: 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 и 1,1 г/кг массы тела (по действующему веществу – доксициклина гиклат). Каждая доза вводилась 6 цыплятам в желудок при помощи зонда. Контрольной группе вводили воду в тех же объемах.

Полученные данные использовались для определения параметров смертельного эффекта – ЛД16, ЛД50 и ЛД84. При этом применялся метод Кёрбера в модификации В.Б. Прозоровского (пробит-анализ). Стандартная ошибка вычислялась по эмпирической формуле Гаддама.

Для характеристики степени развития острого смертельного отравления помимо величины ЛД50, указывающей на степень токсичности, использовались некоторые показатели, характеризующие опасность препарата в условиях введения в желудок. Это величина – «ЛД84/ЛД16», характеризующая вариабельность смертельных доз в виде отношения вероятностных параметров. Величина - «S» - функция угла наклона прямой смертельных доз к оси абсцисс.

Фармакокинетические исследования проводили при использовании HPLC хроматографии с УФ детектором. Данные исследования проводились на хроматографе Стайер Аквилон с колонкой Луна С18: скорость потока 1 мл/мин; объем пробы 20 мкл; длинна волны 360 нм; элюент 40% ацетонитрил с 2% раствором фосфорной кислоты; время анализа 4 минуты; температура колонки 350С.

Объектом исследования служили куры несушки живой массой 3 кг, возраст 1,5 года. Вводился препарат перорально в дозировке 20 мг/кг, в виде раствора препарата разбавленного в дистиллированной воде в 5 раз.

Отбор крови осуществляли через: 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 24; 48; 72; 96; 120 часа.

Расчет концентрации доксициклина в крови исследуемых животных осуществлялся по следующей формуле:

Сантибиотика=((Рант.-0,0642)/15442)×2×1000

где Сантибиотика - концентрация доксициклина в крови мкг/мл;

Рантибиотика – площадь пика в исследуемой пробе.

Результаты и обсуждение.

Нами была разработана оральная форма комплексного препарата, содержащая доксициклина гиклат, бромгексина гидрохлорид, а в качестве вспомогательных веществ - лактулозу и солюфор (поливинилпирролидон). Приводим краткое обоснование сочетания компонентов в разработанном препарате.

Доксициклин (англ. doxycycline) - полусинтетический антибиотик группы тетрациклинов широкого спектра действия. Доксициклин оказывает бактериостатическое действие за счет подавления синтеза белка микроорганизмов. Проникая внутрь клетки, доксициклин действует на внутриклеточно расположенных возбудителей. Подавляет синтез протеинов в микробной клетке, нарушает связь транспортных аминоацил-РНК с 30S субъединицей рибосомальной мембраны. Доксициклин активен в отношении аэробных грамположительных бактерий, а также имеет хорошую активность в отношении аэробных грамотрицательных бактерий. Кроме того интересна способность доксициклина подавлять рост и размножение таких микроорганизмов как Rickettsia spp., Treponema spp., Mycoplasma spp. и Chlamydia spp. К доксициклину устойчивы Pseudomonas aeruginosa, Proteus spp., Serratia spp., большинство штаммов Bacteroides fragilis [9]. В отличие от тетрациклина и окситетрациклина, доксициклин обладает более высокой терапевтической эффективностью, проявляющейся при лечении в 10 раз меньшими дозами, и более длительным действием.

Бромгексин (лат. bromhexinum) - синтетический лечебный препарат. Одной из важных особенностей действия бромгексина является его способность стимулировать образование эндогенного сурфактанта, представляющего собой смесь поверхностно-активных веществ, которая синтезируется и секретируется пневмоцитами. Известно, что сурфактант выполняет ряд защитных действий, в частности обеспечивает стабильность альвеолярных клеток в процессе дыхания и понижает поверхностное натяжение в альвеоле, предупреждая её «спадение» [10]. В доступной литературе имеются работы, посвящённые использованию бромгексина в сочетании с антибиотиками для терапии патологических процессов органов дыхания. В частности, приводятся данные, показывающие эффективность комбинации антибактериальных препаратов с бромгексином при терапии заболеваний бронхов и лёгких [11].

Лактулоза (лат. Lactulose) стимулирует

перистальтику кишечника, улучшает всасывание фосфатов и солей кальция и магния, способствует выведению ионов аммония. Лактулоза способствует нормализации микрофлоры кишечника: в толстом кишечнике она является пищевым субстратом сахаролитической микрофлоры (бифидо- и лактобактерий). Расщепляясь, лактулоза высвобождает ионы водорода, связывает свободный аммиак, увеличивает диффузию аммиака из крови в кишечник и способствует выделению аммиака из организма [12].

Таким образом, представленные данные указывают на высокий терапевтический потенциал разработанного препарата. Сочетание оптимальных концентраций вышеуказанных компонентов позволило сконструировать высокоэффективный комбинированный антибактериальный препарат в форме раствора для выпаивания, обладающий комплексным действием.

Разработанный препарат был изучен на токсичность на белых мышах и на цыплятах бройлерах.

При изучении острой токсичности на белых мышах были установлены данные смертельного эффекта, которые использовались для определения смертельных параметров - ЛД16, ЛД50 и ЛД84. Результаты исследования острой токсичности препарата представлены в таблице № 1.

Таблица 1 - Изучение острой токсичности разработанного препарата на белых мышах при введении в желудок по Кёрберу (The study acute toxicity of the developed preparation on white mice case of introduction into stomach the Kjorberu)

Дозы, мг/кг	100	200	400	600	700
Выжило	6	6	6	5	0
Погибло	0	0	0	1	6
Z	0		0	0,5	3,5
D	100		200	200	100
ZxD	0		0	100	350
LD50	**625**				

Таким образом, было установлено, что ЛД50 данного средства составляет 625 + 12,38 мг/кг по д.в массы тела животного.

Полученный результат свидетельствует о том, что данный препарат относится к 3-ому классу слаботоксичных соединений (ГОСТ 12.1.007-76).

Для количественной оценки опасности средства на смертельном уровне учитывали два показателя – средне смертельную величину и показатель отношения смертельных величин - «S», выраженный через функцию угла наклона прямой летальности к оси абсцисс (ЛД84/ЛД50 + ЛД50/ЛД16):2 =1,1.

Коэффициент опасности смертельного отравления (K) составил - 0,0014 и свидетельствует о низкой опасности острого смертельного отравления данным средством (3 класс).

Клиническая картина интоксикации животных, получивших смертельные дозы, после введения проявлялась в виде симптомов, характерных для смертельного отравления - нарушение координации движения, шатающаяся походка, взъерошенность волосяного покрова, снижение тургора кожи. Вскоре животные впадали в кому. Через 2-3 дня часть из них погибала. При вскрытии наблюдались - умеренная гиперемия слизистой желудка и некоторое полнокровие печени и почек. У животных, получивших дозу 400 мг/кг, клиническая картина интоксикации не выражена.

При изучении острой токсичности на цыплятах бройлерах была установлена доза LD50 = 833 мг/кг массы тела животного. Обработка материала по изучению токсичности проводилась методом Кербера (таб.2).

Полученный результат свидетельствует о том, что данный препарат относится к 4-ому классу малотоксичных соединений (ГОСТ 12.1.007-76).

Коэффициент опасности смертельного отравления (K) составил 1,0х10-3 и свидетельствует о низкой опасности острого смертельного отравления данным средством (4 класс).

Все цыплята после введения препарата в дозах по доксициклину соответственно 300, 500 и 700 мг/кг живой массы остались

Таблица 2 - Изучение острой токсичности разработанного препарата на цыплятах бройлерах (The study acute toxicity of the developed preparation on broiler)

Дозы, мг/кг	300	500	700	900	1100
Выжило	6	6	6	5	0
Погибло	0	0	0	1	6
z		0	0	2,5	5,5
d		200	200	200	200
ZxD		0	0	500	1100
LD50	**833**				

живы. После введения животным препарата в вышеуказанных дозах отмечались явления интоксикации в виде гиподинамии, отказа от корма и воды. Данные симптомы исчезали через 1 – 2 часа после введения препарата.

При проведении фармакокинетических исследований было установлено, что концентрация доксициклина в крови исследуемых животных достигала максимума через 1 час после введения препарата, однако даже на 5 сутки наблюдения в крови присутствуют следы исследуемого антибиотика (Рисунок 1,2).

Анализируя полученные данные, можно заключить следующее: разработанный препарат при однократном введении интенсивно всасывается в кровь и через 1 час достигает максимальной концентрации (Cmax = 0,00419мг/мл). Доксициклин длительное время находится в крови: T1/2 = 5 ч., а максимальное время нахождения в крови при дозе 20 мг/кг достигает 120 часов (таблица 3).

Резюме:

1. Комбинированный антибактериальный препарат на основе доксициклина, лактулозы и бромгексина при однократном введении в желудок является малотоксичным соединением.

2. Установленно, что концентрация доксициклина в крови исследуемых животных достигает максимума через 1 час и составляет 4,19 мкг/мл с дальнейшим падением в 2 раза к 3 суткам и далее сохраняется в концентрации ˜ 1 мкг/мл до 5 суток.

3. Для терапевтических целей препарат может вводиться птице в дозе 10 мг/кг, один раз в день.

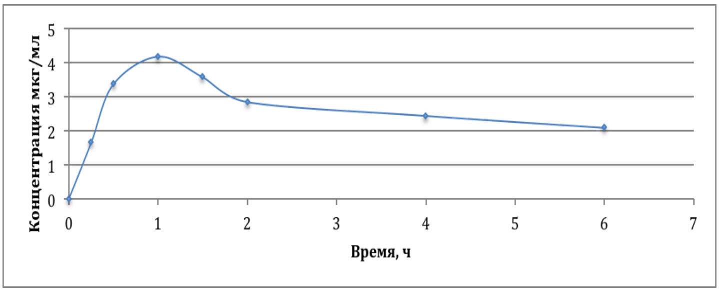

Рисунок 1 - Максимальная концентрация доксициклина в крови исследуемых птиц (The maximal concentration of doxycycline in blood studied birds)

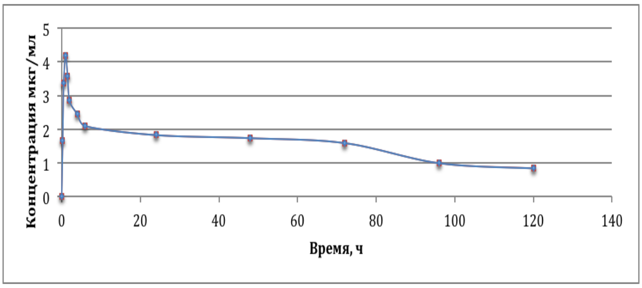

Рисунок 2 - Концентрация и длительность нахождения доксициклина в крови исследуемых птиц (The concentration and duration of doxycycline in blood studied birds)

Таблица 3 - Фармакокинетические параметры (Pharmacokinetic parameters)

№ п/п	Фармакокинетические параметры	Доксициклин
1.	Доза (D) (мг)	20
2.	Максимальная концентрация в плазме (Cmax) (мг/мл)	0,00419
3.	T1/2 (ч)	5
4.	Объем распределения Vd (л)	4,7733
5.	Клиренс Cl (л/ч)	0,663

*Примечание: Доза (D) – доза препарата вводимого птице на килограмм массы тела; C max – наибольшая концентрация препарата в плазме крови животного; Период полувыведения (T1/2) - время, в течение которого концентрация препарата в крови снижается на 50% в результате элиминационнвх процессов; Объем распределения (Vd) расчитывается: D/C max; Общий клиренс (CL) - объем плазмы или крови, полностью освобождающийся от препарата в единицу времени, расчитывается: CL = 0,693 * Vd / T1/2.*

Библиография

1. Исаева А.Ю., Староверов С.А., Волков А.А. [и др.]. Изучение биологических свойств наноразмерной структуры на основе коллоидного селена in vitro // Ветеринарная патология. 2012. № 3 (41). С.111-114.
2. Исаева А.Ю., Староверов С.А., Волков А.А. [и др.]. Конструирование наноразмерной структуры на основе коллоидного селена // Ветеринарная патология. 2012. № 3 (41). С. 114-117.
3. Козлов С.В., Фомин А.С., Степанов В.С. [и др.] Конструирование коллоидного комплекса селена с лактоферрином и изучение его биодинамических свойств // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2012. № 1. С. 27-32.
4. Староверов С.А., Фомин А.С., Волков А.А., [и др.] Использование фаговых мини-антител для определения концентрации ферритина в сыворотке крови животных // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2012. № 4. С. 30-33.
5. Фомин А.С., Малинин М.Л., Василенко О.А., [и др.] Изучение механизмов токсического воздействия туберкулина PPD на клетки иммунной системы лабораторных животных // Ветеринарная патология. 2011. № 3. С. 78-84.
6. Башкирова Е.В., Путина С.Н., Волков А.А., [и др.] Конструирование инъекционной формы на основе силимарина и изучение ее биодинамических и токсикологических свойств. Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2013. № 08. С. 4-6.
7. Tenover F.C. Глобальная проблема антимикробной резистентности. Русский медицинский журнал. 1996, Т.3, N4, С. 217-219.
8. Енгашев С.В., Староверов С.А., Волков А.А., [и др.] Сравнительная характеристика биодинамики хелатного и декстранового комплексов железа. Ветеринария. 2013. № 6. С. 50-52.
9. Griffin M.O., Fricovsky E., Ceballos G., Villarreal F. Tetracyclines: a pleitropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature // Am J Physiol Cell Physiol. -2010.- 299(3): P.539–548.
10. Houtmeyers E., Gosselink R., Gayan-Ramirez G., Decramer M. Effects of drugs on mucus clearance // Eur Respir J.- 1999.-V. 14.-p. 452-467.
11. Matsuda Y., Hobo S., Naito H. Transferability of Cephalothin to the Alveolar Cavity in Thoroughbreds // J. Vet. Med. Sci. -1999.- 61(3).-p. 209–212.
12. Григорьев П. Я., Яковенко Э. П. Лактулоза в терапии заболеваний органов пищеварения // Российский Гастроэнтерологический журнал. - 2000. - № 2.

References

1. Isaeva A.Ju., Staroverov S.A., Volkov A.A. [i dr.]. Izuchenie biologicheskih svojstv nanorazmernoj struktury na osnove kolloidnogo selena in vitro [The study of biological properties of nano-dimensional structures on the basis of colloidal selenium in vitro] // Veterinarnaja patologija. 2012. № 3 (41). C.111-114.
2. Isaeva A.Ju., Staroverov S.A., Volkov A.A. [i dr.]. Konstruirovanie nanorazmernoj struktury na osnove kolloidnogo selena [Designing nano-dimensional structures on the basis of colloidal selenium] // Veterinarnaja patologija. 2012. № 3 (41). S. 114-117.
3. Kozlov S.V., Fomin A.S., Stepanov V.S. [i dr.] Konstruirovanie kolloidnogo kompleksa selena s laktoferrinom i izuchenie ego biodinamicheskih svojstv [Designing a colloidal complex of lactoferrin with selenium and studying its biodynamic properties] // Aktual›nye voprosy veterinarnoj biologii. 2012. № 1. S. 27-32.
4. Staroverov S.A., Fomin A.S., Volkov A.A., [i dr.] Ispol›zovanie fagovyh mini-antitel dlja opredelenija koncentracii ferritina v syvorotke krovi zhivotnyh [Usage of phage mini-antibodies as means of detecting ferritin concentration in animal blood] // Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Sel›skohozjajstvennye zhivotnye. 2012. № 4. S. 30-33.
5. Fomin A.S., Malinin M.L., Vasilenko O.A., [i dr.] Izuchenie mehanizmov toksicheskogo vozdejstvija tuberkulina PPD na kletki immunnoj sistemy laboratornyh zhivotnyh [Study of mechanisms of toxic effects tuberculin ppd cells of immune system of laboratory animals] // Veterinarnaja patologija. 2011. № 3. S. 78-84.
6. Bashkirova E.V., Putina S.N., Volkov A.A., [i dr.] Konstruirovanie in#ekcionnoj formy na osnove silimarina i izuchenie ee biodinamicheskih i toksikologicheskih svojstv [Design of injectable preparation on the basis of silimarin, study of its biodynamic and toxicological properties] // Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im. N.I. Vavilova. 2013. № 08. S. 4-6.
7. Tenover F.C. Глобальная проблема антимикробной резистентности. Русский медицинский журнал. 1996, Т.3, N4, С. 217-219. Global›naja problema antimikrobnoj rezistentnosti [Global problems of antimicrobial resistance] // Russkij medicinskij zhurnal. 1996, T.3, N4, S. 217-219.
8. Engashev S.V., Staroverov S.A., Volkov A.A., [i dr.] Sravnitel›naja harakteristika biodinamiki helatnogo i dekstranovogo kompleksov zheleza [Comparative data biodynamics chelate complexes of iron and

dextran] // Veterinarija. 2013. № 6. S. 50-52.
9. 9.-11. Vide supra.
12. Grigor›ev P. Ja., Jakovenko Je. P. Laktuloza v terapii zabolevanij organov pishhevarenija [Treatment of the patients with digestive system diseases with lactulose] // Rossijskij Gastrojenterologicheskij zhurnal. - 2000. - № 2.

UDC 619:636.09:633.88

Sazykina K.I., Engashev S.V., Volkov A.A., Staroverov S.A., Kozlov S.V.

CREATING A COMPLEX ANTIBACTERIAL PREPARATION BASED ON THE DOXYCYCLINE, LACTULOSE AND BROMHEXINE

SUMMARY
Combination of components in the preparation is justified. Acute toxicity data of the elaborated antibacterial complex are received. The study of preparation acute toxicity when introducing into stomach is done with white mice and broiler chickens. Toxicity class is defined – the elaborated preparation belongs to the 3rd class of slightly toxic compounds. Pharmacokinetic properties of the given antibacterial preparation are studied: at a single dose the elaborated preparation is intensively absorbed into the blood stream, and in an hour it reaches its maximum concentration (C max=0.00419 mg/ml). It is proved that antibiotic doxycycline remains in the blood for a long period of time: T ½ = 5h. Maximum time period of preparation presence in the blood is investigated: at 20mg/kg dose doxycycline remains during 120 hours. Received data prove the prolonged action of the elaborated antibacterial complex. On the basis of experimental data it is stated that for therapeutic purposes the preparation can be introduced into poultry at 10mg/kg dose one time per day.

Keywords: antibiotic agents, doxycycline, bromhexine, lactulose, acute toxicity, pharmacokinetics, toxicology.

Контактная информация об авторах для переписки

Сазыкина Ксения Игоревна, аспирант кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Енгашев Сергей Владимирович, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий научно-внедренческим центром «Агроветзащита»

Волков Алексей Анатольевич, доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Терапия, клиническая диагностика, фармакология и радиобиология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Староверов Сергей Александрович, доктор биологических наук, начальник отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН г. Саратов, профессор кафедры «Терапия, клиническая диагностика, фармакология и радиобиология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Козлов Сергей Васильевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Ksenia Igorevna Sazykina, PhD student of “Therapy, obstetrics and pharmacology” department of Federal State Budget Educational Establishment of Higher Professional education Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov.

Sergei Vladimirovich Engashev, D.Sc. in Veterinary Medicine, Professor, the head of the Scientific Research Center «Agrovetzatshita»

Aleksey Anatolevich Volkov, D.Sc. in Veterinary Medicine, Professor, the head of the chair «Therapy, Obstetrics and Pharmacy» of Saratov State Agricultural Universitynamed afterN.I. Vavilov

Sergei Aleksandrovich Staroverov, D.Sc. in Biology, the head of the biochemistry and immunology department of the All-Russian Research Institute for Animal Health (Saratov), Professor at the chair «Therapy, Obstetrics and Pharmacy» of Saratov State Agricultural University named after N.I. Vavilov

Sergei Vasilevich Kozlov, Ph. D. in Veterinary Medicine of Veterinary Science, Associate Professor at the chair «Therapy, Obstetrics and Pharmacy» of Saratov State Agricultural University named after N.I. Vavilov